



# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività  
 Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 09 MAR 2004

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND.

N. RM2002A000629 DEL 19.12.2002



Si dichiara che l'unica copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)

1 MAR. 2004

IL DIRIGENTE  
 Dr. A. CAPONE

IL DIRIGENTE

*Angel Capone*

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA  
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE. DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.  
Residenza ROMA

codice 00885531004

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

via

n. città

cap

(prov)

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via Le Shakespeare, 47

n. 10047 città Roma

cap 00144

(prov) RM

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) gruppo/sottogruppo  
"uso di acidi alfa-feniltiocarbossilici e alfa-fenilossicarbossilici ad attività ipoglicemizzante e/o ipolipidemizzante".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI  NO

E. INVENTORI DESIGNATI

1) GIANNESSI Fabio cognome nome

SE ISTANZA: DATA 1/1/1/1 N° PROTOCOLLO 1/1/1

2) TINTI Maria Ornella

3) PESSOTTO Pompeo cognome nome

4) DELL'UOMO Natalina

F. PRIORITÀ

azione o organizzazione NESSUNA

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

SCIOLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

1/1/1/1	1/1/1/1
1/1/1/1	1/1/1/1
1/1/1/1	1/1/1/1
1/1/1/1	1/1/1/1

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 12 PROV n. pag 148

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) 10 PROV n. tav. 1

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3) 10 RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4) 10 RIS

designazione inventore

Doc. 5) 10 RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) 10 RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) 10

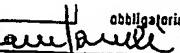
nominaio completo del richiedente

8) attestato di versamento, totale lire 291,80 (duecentonovantuno/80)

10,33 Euro

COMPILATO IL 19/12/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

Domenico Campanelli 

obbligatorio

CONTINUA SI/NO 1

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO 1

CAMERA DI COMMERCIO L.A.A. DI

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

REG. 2002 A 000629 codice 581

L'anno millenovocento

Due mila due

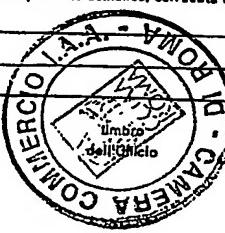
J. il giorno diciannove

. del mese di Dicembre

Il(I) richiedente(I) sopraindicato(I) ha(banno) presentato a me sottoscritta la presente domanda, corredata di n. 101 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopra riportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE  
Giuseppe Iaia

FOGLIO ACQUINTATIVO n. 101 di 1000 101

RM 2002 A 000629

**AGGIUNTA MODULO A**

SEQ. 4

#### **4. EIGENTEILENTE III**

**E. INVENTARI DESIGNATI**

**tegnome nome**  
95 SCIARRONI Anna Fioriana  
96 TASSONI Emanuela  
97 BRUNETTI Tiziana  
98 MILAZZO Ferdinando Mario

cognata nana

E. BURROA

#### **Plant a garden**

100

1

SCHOLARSHIP: RESERVE

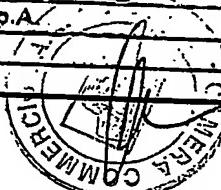
AN-PRB16

#### SIRMA DEL VIL PIGHIERE

Batt. Detribus: Gennadios

Dott. Domenico Campanelli  
SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE BENEVENTO

**SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE DI COMITATO**



RIASSUNTO INVENTORE CON DISEGNO PRINCIPALE  
RM 2002 A 000629

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

19.12.2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

Residenza

Viale Shakespeare, 47 - 00144 Roma

B. TITOLO

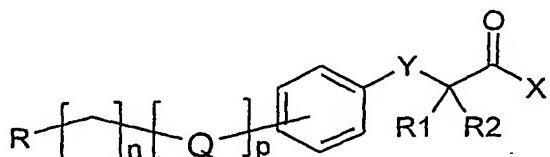
"uso di acidi alfa-feniltiocarbossilici e alfa-fenilossicarbossilici ad attività ipoglicemizzante e/o ipolipidemizzante".

Classe proposta (sez/classe) \_\_\_\_\_

(gruppo/sottogruppo) \_\_\_\_\_

C. RIASSUNTO

Viene descritto l'uso di derivati di acidi alfa-feniltiocarbossilici e alfa-fenilossicarbossilici di formula (I):



(I)

in cui i sostituenti hanno i significati riportati nel testo, per la preparazione di un medicamento per la profilassi e trattamento del diabete, in particolare di tipo 2, delle sue complicanze, delle varie forme di insulino-resistenza, e delle iperlipidemie.

D. DISEGNO



**RM 2002 A 000629**

**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE  
RIUNITE S.p.A**

**RM 2002 A 000629**

La presente invenzione riguarda l'uso di derivati di acidi  $\alpha$ -feniltiocarbossilici e  $\alpha$ -fenilossicarbossilici, per la preparazione di un medicamento ad attività ipoglicemizzante e/o ipolipidemizzante di formula generale (I).

5

### **Sfondo dell'invenzione**

Il diabete è una malattia largamente diffusa nel mondo ed è associata ad importanti complicanze cliniche, che includono complicanze microvascolari quali la retinopatia diabetica, la neuropatia diabetica, la nefropatia diabetica, e complicanze macrovascolari quali l'aterosclerosi, le vasculopatie periferiche, l'infarto del miocardio, l'ictus.

L'insulino resistenza che caratterizza il diabete è inoltre implicata nella sindrome X, nella sindrome policistica ovarica, nell'obesità, nell'ipertensione, nelle iperlipidemie e nelle ipercolesterolemie (J. Am 15 Osteopath Assoc 2000 Oct; 100(10):621-34; Jama 2002 Nov 27;288(20):2579-88).

È noto che le iperlipidemie, le ipercolesterolemie e l'ipertensione rivestono un ruolo determinante nell'insorgenza del CHD (coronary heart disease).

20 È altresì noto che un aumento della glicosilazione delle proteine è implicato con le complicanze del diabete sopra citate (Diabetologia 2001 Feb; 44(2):129-46).

Dette complicanze costituiscono una grave minaccia alla vita e al benessere dell'individuo.

Sono note diverse forme cliniche della malattia diabetica e le più comuni sono il diabete di tipo 2 e quello di tipo 1. Il diabete di tipo 2 è caratterizzato da una riduzione della sensibilità all'azione dell'insulina (insulino-resistenza) e determina nell'organismo un aumento dei livelli dell'insulina stessa nel tentativo di compensare questo difetto ed il conseguente aumento dei livelli di glucosio. Ci sono numerose conferme di implicazione dell'insulino-resistenza in molte condizioni patologiche oltre che lo stesso diabete di tipo 2, come dislipidemia, obesità, ipertensione arteriosa e certe manifestazioni macrovascolari e microvascolari caratteristiche della stessa malattia diabetica. L'associazione di insulino-resistenza con obesità, ipertensione e dislipidemia è nota come Sindrome X.

Per il trattamento del diabete di tipo 2 sono disponibili sul mercato farmaci di vecchia data come le biguanidi e le sulfoniluree. Non è ancora chiaro il meccanismo di azione della metformina, la più nota delle biguanidi, che presenta come effetti collaterali disturbi gastrointestinali e il pericolo di acidosi in condizioni di insufficienza renale, cardiaca, epatica, polmonare ecc. Le sulfoniluree promuovono la secrezione di insulina da parte delle  $\beta$ -cellule e hanno come possibile effetto collaterale episodi di ipoglicemia. Inoltre tutte le monoterapie con sulfoniluree o con la metformina sono destinate nel tempo a fallire (UKPDS Study).

Di recente introduzione nel mercato sono i tiazolidinedioni, composti antidiabetici insulino-sensibilizzanti come troglitazone (*J. Med. Chem.*, 1989, 32, 421-428), pioglitazone (*Arzneim. Forsch./Drug Res.*,

1990, 40 (1), 37-42), e rosiglitazone (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994,

4, 1181-1184) che sono in grado di ridurre l'iperglycemia diabetica ed i livelli di insulina. Gli effetti collaterali già evidenziati per il troglitazone e temuti per altri composti di questa classe sono:

5       epatossicità (che ha causato il ritiro del troglitazone dal commercio in USA), aumento di LDL-colesterolo, aumento di peso ed edema.

Questi composti sono ligandi sintetici ad alta affinità per il Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (*J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 12953-12956).

10 I Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) sono dei recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari che hanno la funzione di controllo dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi (*J. Med. Chem.*, 2000, 43, 527-550). Sono stati individuati diversi sottotipi di PPAR: PPAR $\gamma$ ,

15 PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$  (anche conosciuto come  $\delta$ ). L'isoforma gamma (PPAR $\gamma$ ) è implicata nella regolazione della differenziazione degli adipociti e nell'omeostasi energetica, l'isoforma alfa (PPAR $\alpha$ ) controlla invece l'ossidazione degli acidi grassi risultante in una modulazione dei livelli dei lipidi nel plasma. È importante notare che

20 la riduzione dei lipidi, che si ottiene nei roditori con gli agonisti del PPAR $\gamma$ , come il rosiglitazone, ha scarso riscontro nell'uomo, mentre la riduzione lipidica determinata nei roditori dai fibrati è confermata nell'uomo. È stata confermata, in studi di relazione struttura-attività mirati alla individuazione di nuove molecole a potenziale azione antidiabetica, una corrispondenza tra l'attivazione del



recettore PPAR $\gamma$  e l'attività ipoglicemizzante (*J. Med. Chem.*, 1996, 39, 665-668; *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 5020-5036; 5037-5054; 5055-5069). L'azione insulino-sensibilizzante sembrerebbe essere collegata all'azione di reclutamento degli acidi grassi regolata dal recettore PPAR $\gamma$  attivato, che porterebbe ad un miglioramento dell'insulino-resistenza dei tessuti migliorando la glicemia e abbassando i livelli di insulina (*Diabetes*, 1998, 47, 507-514).

Negli ultimi anni sono emerse molecole a profilo misto, cioè ligandi del PPAR $\gamma$  e del PPAR $\alpha$  (KRP 297, *Diabetes*, 1998, 47, 1841-1847;

DRF 2725, *Diabetes*, 2001, 50, suppl.2, A108; AZ 242, *Diabetes*, 2001, 50, suppl. 2, A121-A122; WO 01/16120). In questa ottica si colloca la recentissima pubblicazione di un brevetto Smithkline Beecham (WO 02/067912 pubblicato il 6 settembre 2002) che fa riferimento ad una nuova classe di composti definiti come "PPAR pan agonisti" capaci cioè di attivare tutte e tre le isoforme dei PPAR in modo da minimizzare gli effetti indesiderati dell'attivazione di PPAR $\gamma$ . In particolare questa nuova classe di antidiabetici pur mantenendo le caratteristiche tipiche dell'attivazione del PPAR $\gamma$ , comporterebbe un minor aumento di peso e un edema più lieve.

Questi composti sono potenzialmente in grado di esercitare un buon controllo della malattia diabetica presentando un'azione ipoglicemizzante e ipolipemizzante con minori effetti collaterali tipici della prima serie di composti della classe dei tiazolidinedioni, ligandi esclusivi del recettore PPAR $\gamma$ . Le strutture rivendicate nei brevetti

WO 01/16120 e WO 02/067912 hanno in comune la caratteristica di presentare una porzione fibrato-like.

Non tutta la comunità scientifica è però d'accordo con quanto finora riportato. Infatti, studi su composti di nuova generazione, 5 derivati tiazolidinedionici e non (MC555, *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273 (49), 32679-32684; NC2100 *Diabetes*, 2000, 49, 759-767, YM440, *Metabolism*, 2000, 49, 411-417), in test di transattivazione genica, esperimenti in *vitro* di *uptake* del glucosio con tessuto muscolare ed esperimenti in *vivo* su animali transgenici con 10 defezienze di espressione del recettore PPAR $\gamma$ , hanno fatto ipotizzare la mancanza di una diretta relazione tra l'attivazione del recettore PPAR $\gamma$  e l'attività ipoglicemizzante e ipolipidemica di questi composti (Toxicology Letters, 2001, 120, 9-19).

A conferma di questo ci sono autori che hanno scelto di 15 utilizzare screening in *vivo* su animali diabetici (topi db/db, topi ob/ob), per individuare possibili insulino-sensibilizzanti non necessariamente buoni ligandi del PPAR. Da questi esperimenti sono stati selezionati composti ancora in studio con un'interessante attività antidiabetica su modelli animali (DRF 2189, *J. Med. Chem.*, 20 1998, 41, 1619-1630; JTT-501, *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 1927-1933).

La comunità scientifica sembra ora orientata alla ricerca di nuovi composti con un meccanismo d'azione diverso che abbiano un effetto simile o superiore sull'insulino-sensibilità e sull'omeostasi del 25 glucosio senza effetti tossici (*J. Med. Chem.*, 2001, 44, 2601-2611) e

che siano dotati di attività ipolipidemizzante superiore a quella degli antidiabetici in uso, vecchi e nuovi.

L'iperlipidemia è un aspetto grave della patologia diabetica costituendo con l'ipertensione spesso presente, un fattore di rischio per l'aterosclerosi e per la malattia cardiovascolare che è la prima causa di morte nel diabete.

La necessità di ridurre i lipidi del sangue è spesso fronteggiata con i fibrati; che nonostante i risultati positivi ottenuti nell'insulino-resistenza non hanno mai avuto successo come ipoglicemizzanti

10

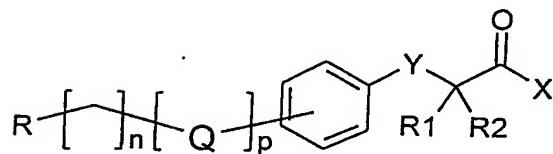
### Riassunto dell'invenzione

È stato ora trovato che composti aventi la formula (I) sotto riportata sono agenti attivi come ipoglicemizzanti e/o come ipolipidemizzanti in grado di incrementare, in particolare, i livelli di HDL colesterolo.

I composti di formula (I) sono dotati di bassa tossicità e sono pertanto utili per il trattamento delle iperglicemie e/o iperlipidemie e per aumentare i livelli di HDL colesterolo.

Applicazioni preferite sono la profilassi ed il trattamento del diabete, in particolare di tipo 2, delle complicanze microvascolari del diabete quali la retinopatia diabetica, la neuropatia diabetica, la nefropatia diabetica; delle complicanze macrovascolari del diabete quali l'aterosclerosi, le vasculopatie periferiche, l'infarto del miocardio, l'ictus; della sindrome X, della sindrome policistica ovarica, dell'obesità, delle iperlipidemie, delle ipercolesterolemie, dell'ipertensione, delle varie forme di insulino-resistenza, e la prevenzione primaria e secondaria del CHD (coronary heart disease).

È pertanto oggetto della presente invenzione l'uso dei composti di formula (I):



(I)

in cui:

R rappresenta -H; arile o eteroarile, mono, biciclici o triciclici

5 eventualmente sostituiti con uno o più gruppi alogeno, nitro, idrossi, alchile e alcossi eventualmente sostituiti con uno o più gruppi alogeno;

n rappresenta 0-3;

p rappresenta 0-1;

10 X rappresenta -OH, -O-alchile C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R1 ed R2 uguali o diversi sono scelti tra: -H; alchile C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, -COX;

Q è scelto fra: NH, O, S, -NHC(O)O-, NHC(O)NH-, -NHC(O)S-, -OC(O)NH-, -NHC(S)O-, -NHC(S)NH-, -C(O)NH-;

15 e Y rappresenta O, S;

e dei loro sali farmaceuticamente accettabili, le miscele racemiche, i singoli enantiomeri, stereoisomeri o isomeri geometrici e tautomeri, per la preparazione di un medicamento per la profilassi e trattamento del diabete, in particolare di tipo 2, delle complicanze

20 microvascolari del diabete, quali la retinopatia diabetica, la



neuropatia diabetica, la nefropatia diabetica; delle complicanze macrovascolari del diabete, quali l'aterosclerosi, le vasculopatie periferiche; l'infarto del miocardio, l'ictus; della sindrome X, della sindrome policistica ovarica, dell'obesità, delle iperlipidemie, delle 5 ipercolesterolemie, dell'ipertensione, delle varie forme di insulino-resistenza, per la prevenzione primaria e secondaria del CHD (coronary heart disease), e per aumentare i livelli di HDL colesterolo.

Ulteriore oggetto della presente invenzione sono composizioni farmaceutiche che comprendono come principio attivo uno o più 10 composti di formula (I) ed almeno un diluente e/o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

### **Descrizione dettagliata dell'invenzione**

Nei composti di formula (I) un primo gruppo di composti preferiti è rappresentato dai composti nei quali R è un arile, 15 eventualmente sostituito con uno o più atomi di alogeno, alchile, alcossi o aloalchile, preferibilmente metile, metossi o trifluorometile, nitro, mono- o di-alchilammina.

Nell'ambito di questo primo gruppo, preferibilmente p è 1, n è 0, 1 o 2, Q è ossigeno.

20 Un secondo gruppo di composti preferiti è rappresentato dai composti nei quali R è un eteroarile, preferibilmente contenente azoto come eteroatomo, ad esempio indolo e carbazolo, legati al resto della molecola attraverso tutte le posizioni consentite; tra questi, sono particolarmente preferiti i gruppi 1-indolile e 1-carbazolile.

Nell'ambito di questo secondo gruppo, preferibilmente p è 1, n è 0, 1 o 2, Q è ossigeno.

Sono particolarmente preferiti i seguenti composti, preparati secondo i metodi generali e le procedure sintetiche di seguito 5 descritte, che illustrano ma non limitano l'invenzione:

- i. Metil 2-[3-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2195);
- ii. Acido 2-[3-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]-2-metilpropanoico (ST2518);
- iii. Metil 2-[4-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST1929);
- iv. Metil 2-[3-(2-(2,4-diclorofenil)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2534);
- v. Metil 2-[4-(2-(2,4-diclorofenil)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2531);
- vi. Metil 2-[3-(2-(carbazol-9-il)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2365);
- vii. Metil 2-[4-(2-(carbazol-9-il)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2387);
- viii. Metil 2-[4-[2-(1-indolil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST1983);
- ix. Metil 2-[3-[2-(1-indolil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2394);
- x. Metil 2-[3-[2-(2-naftil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2167);
- xi. Metil 2-[4-[2-(2-naftil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2011).

20 E' particolarmente preferito il composto ST2195.

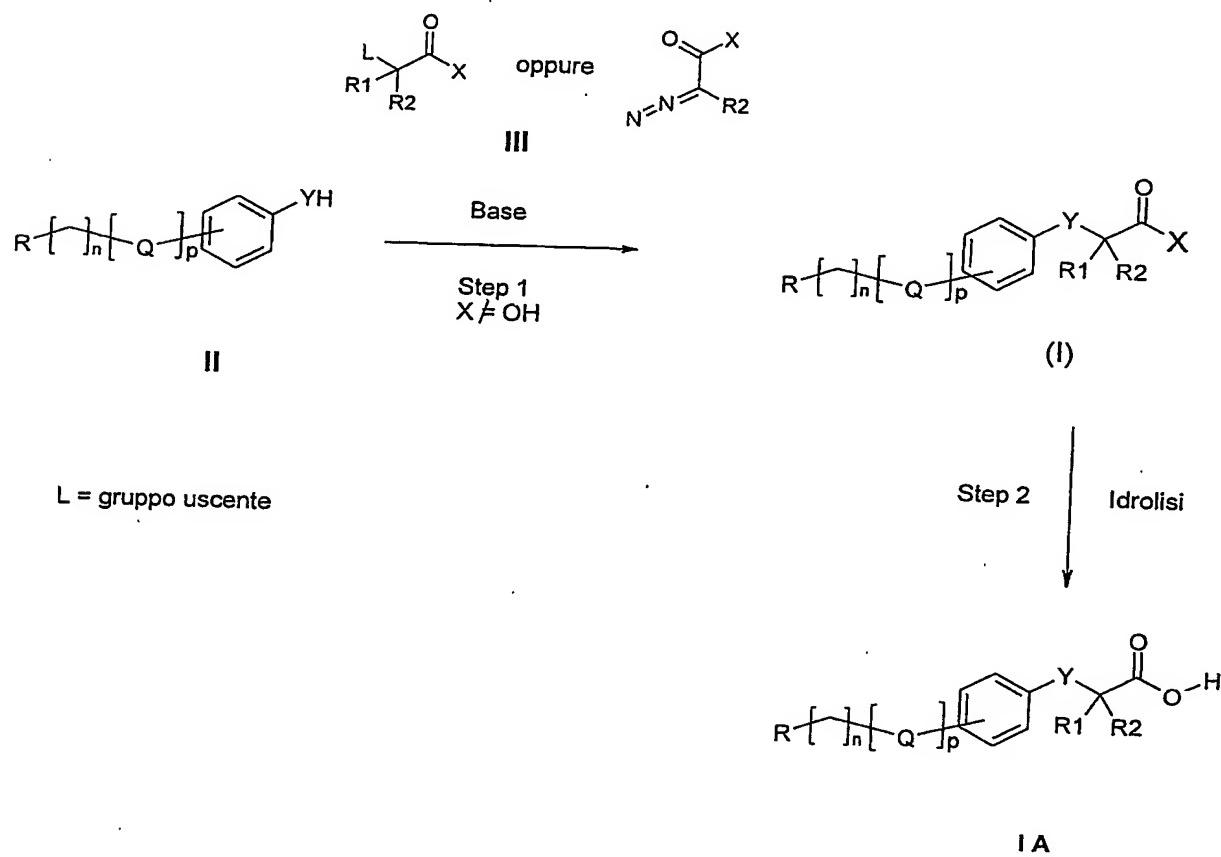
I composti di formula (I) sono preparati utilizzando le reazioni descritte nei metodi Generali A-C.

#### **Metodi generali di sintesi**

I seguenti schemi illustrano i metodi utilizzati per la sintesi dei 25 composti di formula (I).

Dove non altrimenti specificato, il significato dei vari simboli è coincidente con quello riportato nella formula generale (I). Il procedimento di idrolisi descritto nel metodo A può essere applicato anche agli altri metodi.

## 5 METODO A

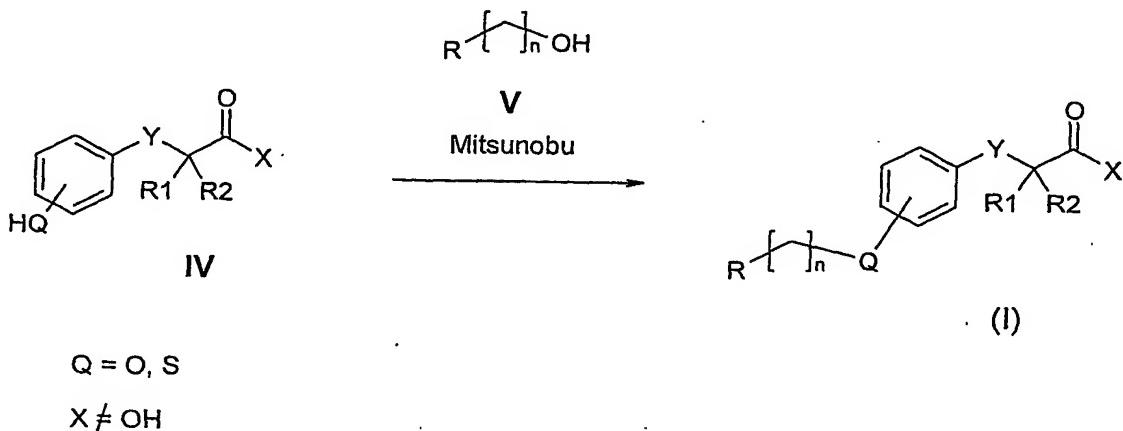


La preparazione dei composti di formula generale (I) venne effettuata facendo reagire con una base, preferibilmente inorganica, preferibilmente sodio idruro, il composto di formula generale **II** per formare l'anione corrispondente il quale venne poi fatto reagire con un composto di formula generale **III** contenente un gruppo uscente,

10

come cloro, bromo, iodio, mesile, tosile e diazo (nel caso del gruppo diazo, invece di una base inorganica si usa rodio bivalente acetato dimero come catalizzatore), ad esempio 2-metil-alfa-bromoisobutirrato, in un solvente polare come acetonitrile, toluene o preferibilmente dimetilformammide, per un tempo compreso fra 18 e 48 ore a temperatura compresa fra 10 e 50°C, preferibilmente a 25°C. Il prodotto così ottenuto venne sottoposto ad idrolisi basica o acida, utilizzando ad esempio NaOH, oppure ad esempio una miscela di HCl/acido acetico, ad una temperatura compresa fra 10 e 100°C, preferibilmente 25°C, per un tempo compreso fra 1 ora e 72 ore, preferibilmente 3 ore, per fornire l'acido corrispondente **I A**.

#### METODO B



La preparazione dei composti aventi formula generale **(I)** venne effettuata a partire da composti di struttura generale **IV**, che vennero fatti reagire con un alcol di struttura generale **V** nelle condizioni classiche delle reazioni di Mitsunobu, come descritto in *Synthesis* 1981, 1-28, utilizzando solventi anidri e aprotici come



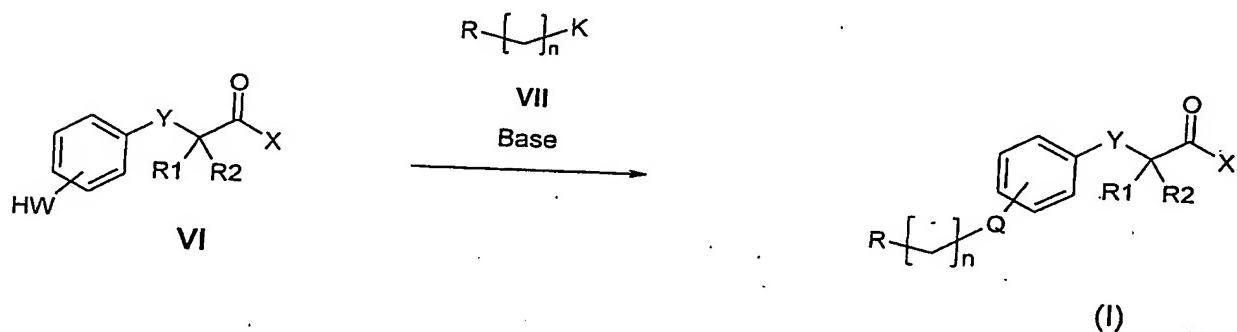
**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE  
RIUNITE S.p.A.**

13

benzene, toluene, etere o preferibilmente tetraidrofuranico, per un tempo compreso fra 30 minuti e 72 ore, preferibilmente 48 ore, a temperatura compresa fra 10 e 40 °C, preferibilmente a 25°C.

## METODO C

5



$w = O, NH, S$

$$K = -NCS, \quad -NCO, \quad -OC(O)Cl, \quad -COOH$$

$Q \neq N, O, S$

I composti preparati con questo metodo vennero ottenuti a partire da **VI** sciolto in solventi aprotici, ad esempio toluene, etere, benzene, preferibilmente tetraidrofurano, poi addizionato del relativo isocianato, tioisocianato o cloroformiato **VII**, eventualmente in presenza di una base inorganica o organica, preferibilmente trietilammina in quantità catalitica o stochiometrica e lasciando reagire per un tempo compreso fra 6 e 72 ore, preferibilmente 48 ore a temperatura compresa fra 10 e 40°C, preferibilmente 25°C. Nel caso in cui K è uguale a COOH si utilizzarono degli agenti condensanti come dietilfosforocianidato, EEDQ, DCC o CDI e simili in rapporto di 1-3 equivalenti rispetto ai substrati, preferibilmente 1-

1.5 equivalenti, oppure si passò attraverso la formazione di cloruro dell'acido, effettuando la reazione di condensazione in solventi organici come DMF, CH<sub>3</sub>CN, CHCl<sub>3</sub>, THF e simili, ad una temperatura compresa tra 20 e 80°C, preferibilmente 25°C, in un tempo di reazione compreso tra 18 ore e 3 giorni, preferibilmente 24 ore.

I seguenti esempi illustrano ulteriormente, ma non limitano, l'invenzione:

**Esempio 1**

10 Preparazione di metil 2-[3-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2195)

Preparazione dell'intermedio metil 2-(3-idrossifeniltio)isobutirrato

*Metodo A (step 1)*

Il prodotto venne preparato a partire da 3-mercaptovenolo (2.000 g, 15.9 mmoli) in 40 mL di CH<sub>3</sub>CN anidro, NaH 80 % (0.572 g 19.1 mmoli) a 0°C. Dopo 5 minuti si aggiunse alla sospensione metil-2-bromo-isobutirrato (2.88 g, 15.9 mmoli). La miscela di reazione così ottenuta venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo la miscela venne versata in H<sub>2</sub>O ed estratta con etile acetato. La fase organica venne essiccata su sodio sulfato anidro e tirata a secco. Il residuo ottenuto venne purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 98/2. Si ottennero 2.900 g di prodotto (resa: 81%); Pf (punto di fusione): 41.5 – 42.5°C; TLC: gel di silice, eluente CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 98/2, Rf (rapporto frontale): 0.23; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>,

300 MHz) δ: 7.19 (t, 1H), 7.00 (d, 1H), 6.95 (brt, 1H), 6.81 (dd, 1H),  
3.69 (s, 3H), 1.50 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 (5 μm) 4.6  
x 250 mm, T: ambiente, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v), pH: tal  
quale, flusso: 0.75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di  
ritenzione 13.82 min; KF: 0.3 % H<sub>2</sub>O; A.E. conforme per C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>S.

5 Preparazione di metil 2-[3-[2-(4-clorofenil)etossifeniltio]isobutirrato  
(ST2195)

*Metodo B*

Il prodotto venne preparato a partire da metil 2-(3-  
10 idrossifeniltio)isobutirrato (preparato come descritto sopra) (1.00 g,  
4.42 mmoli), e 4-clorofenetil alcol (0.692 g, 4.42 mmoli) in 15 mL di  
THF anidro, a cui si aggiunsero DIAD (1.16 g, 5.75 mmoli) e  
trifenilfosfina (1.500 g, 5.75 mmoli) a piccole porzioni mantenendo la  
temperatura al di sotto dei 30°C. La reazione venne lasciata sotto  
15 agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo  
questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato  
mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente  
esano/AcOEt 9/1. Si ottennero 1.146 g di prodotto oleoso (resa:  
71%); TLC: gel di silice, eluente esano/AcOEt 9/1, R<sub>f</sub> = 0.28; <sup>1</sup>H  
20 NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 7.25 (m, 6H), 7.00 (m, 1H), 6.90 (d, 1H),  
4.15 (t, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.08 (t, 2H), 1.55 (s, 6H); HPLC: Colonna:  
Inertisil ODS 3 (5 μm) 4.6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile  
CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 80/20 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.75 mL/min,  
rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 19.34 min; KF: 1.7 %  
25 H<sub>2</sub>O; A.E. conforme per C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>3</sub>S.

**Esempio 2**

Preparazione di acido 2-[3-[2-(4-clorofenil)etossifeniltio]-2-metilpropanoico (ST2518)

*Metodo A (step 2)*

- 5 Il prodotto venne preparato a partire da una soluzione di ST2195 (preparato come descritto nell'esempio 1) (0.150 g, 0.41 mmoli) in 9 mL di metanolo a cui vennero aggiunti 4 mL di NaOH 1N. La soluzione così ottenuta venne lasciata per 48 ore a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Dopo questo tempo la 10 soluzione venne diluita con acqua, acidificata con HCl 1N e la fase acquosa estratta con AcOEt. La fase organica venne essiccata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrata ed il solvente evaporato sotto vuoto. Si ottennero 0.128 g (resa: 88 %); Pf: 105-106°C; TLC: gel di silice, eluente CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9.4/0.6, Rf: 0.42; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) 15 δ: 7.45 (m, 5H), 7.10 (m, 2H), 6.80 (dd, 1H), 4.15 (t, 2H), 3.05 (t, 2H), 1.50 (s, 6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C<sub>18</sub> (5 μm) 4.6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/acetato d'ammonio 10 mM 35/65 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.80 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 4.66 min; A.E. conforme per C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>3</sub>S.

20 **Esempio 3**

Preparazione di metil 2-[4-[2-(4-clorofenil)etossifeniltio]isobutirrato (ST1929)

Preparazione dell'intermedio metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato

- Il prodotto del titolo venne preparato secondo la procedura descritta 25 nel *metodo A (step 1)* a partire da 4-mercaptofenolo (0.500 g, 4.0



mmoli) in 10 mL di CH<sub>3</sub>CN anidro, a cui venne aggiunto NaH 80% (0.144 g, 4.8 mmoli). La miscela venne raffreddata a 0°C e dopo 5 minuti venne aggiunto metil- $\alpha$ -bromoisobutirrato (0.724 g, 4.0 mmoli). La reazione venne lasciata a temperatura ambiente per due 5 giorni sotto agitazione magnetica. Dopo questo tempo la miscela venne versata in H<sub>2</sub>O ed estratta con etile acetato, la fase acquosa venne quindi acidificata con HCl 1N ed estratta nuovamente con etile acetato. Le fasi organiche riunite vennero essiccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate ed evaporate. Il residuo ottenuto venne purificato mediante 10 cromatografia su gel di silice usando come eluente CHCl<sub>3</sub>. Si ottengono 0.760 g di prodotto (resa: 84%); Pf: 110-112°C; TLC: gel di silice, eluente CHCl<sub>3</sub>, Rf: 0.11; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 7.30 (d, 2H), 6.73 (d, 2H), 5.57 (brm, 1H), 3.70 (s, 3H), 1.45 (s, 6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C<sub>18</sub>, (5μm) 4.6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile 15 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 10.14 min; A.E. (analisi elementare) conforme per C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>S.

Preparazione di metil 2-[4-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST1929)

20 Il prodotto del titolo venne preparato secondo la procedura descritta nel *metodo B* a partire da metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (preparato come descritto sopra) (0.800 g, 3.54 mmoli) e 4-clorofenetil alcol (0.554 g, 3.54 mmoli) in 20 mL di THF anidro. Si aggiunsero DEAD (0.801 g, 4.6 mmoli) e trifenilfosfina (1.205 g, 4.6 mmoli) a piccole porzioni mantenendo la temperatura al di sotto dei 25

30°C. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/etile acetato 9/1. Si ottennero 5 0.416 g di prodotto oleoso (resa: 32%); TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 9/1, Rf: 0.32;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 7.40-7.19 (m, 6H), 6.80 (d, 2H), 4.15 (t, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.08 (t, 2H) 1.45 (s, 6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C<sub>18</sub>, (5 $\mu\text{m}$ ) 4.6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  70/30 (v/v), pH: tal quale, flusso: 10 0.75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 31.40 min; KF: 0.4 %  $\text{H}_2\text{O}$ ; A.E. conforme per C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>3</sub>S.

#### Esempio 4

Preparazione di metil 2-[3-(2-(2,4-diclorofenil)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2534)

15 Il prodotto del titolo venne preparato secondo la procedura descritta nel *metodo B* a partire da metil 2-(3-idrossifeniltio)isobutirrato (preparato come descritto nell'esempio 1) (0.280 g, 1.24 mmoli) e DIAD (0.325 g, 1.61 mmoli) sciolti in 3 mL di THF anidro e aggiunti goccia a goccia ad una soluzione di 2,4-diclorofenetilalcol (0.260 g, 20 1.36 mmoli), e trifenilfosfina (0.422 g, 1.61 mmoli) in 4 mL di THF anidro a 0 °C. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/AcOEt 25 9.6/0.4. Si ottennero 0.327 g di prodotto oleoso (resa: 66%); TLC: gel

di silice, eluente esano/AcOEt 9/1, Rf: 0.34;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 7.40 (d, 1H), 7.20 (m, 3H), 7.00 (m, 2H), 6.90 (dd, 1H), 4.15 (t, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.20 (t, 2H), 1.45 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 (5  $\mu\text{m}$ ) 4.6 x 250 mm, T: ambiente, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 90/10 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.8 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 12.40 min; KF: 0.2 % H<sub>2</sub>O; A.E. conforme per C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S.

### Esempio 5

<u>Preparazione</u>	<u>di</u>	<u>metil</u>	<u>2-[4-(2-(2,4-</u>
10			<u>diclorofenil)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2531)</u>

Il prodotto del titolo venne preparato secondo la procedura descritta nel *metodo B* a partire da metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (preparato come descritto nell'esempio 3) (0.280 g, 1.24 mmoli) e DIAD (0.325 g, 1.61 mmoli) sciolti in 3 mL di THF anidro e aggiunti 15 goccia a goccia ad una soluzione di 2,4-diclorofenetilalcol (0.260 g, 1.36 mmoli), e trifenilfosfina (0.422 g, 1.61 mmoli) in 4 mL di THF anidro a 0 °C. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante 20 cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/AcOEt 9.6/0.4. Si ottennero 0.346 g di prodotto (resa: 70%); Pf: 73-74°C; TLC: gel di silice, eluente esano/AcOEt 9/1, Rf: 0.26;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 7.35 (m, 3H), 7.22 (m, 2H), 6.83 (d, 2H), 4.18 (t, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.20 (t, 2H), 1.45 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil 25 ODS - 3 (5  $\mu\text{m}$ ) 4.6 x 250 mm, T: ambiente, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O

85/15 (v/v), pH: tal quale, flusso: 1 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 12.58 min; KF: 0.4 % H<sub>2</sub>O; A.E. conforme per C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S.

### Esempio 6

5    Preparazione di metil 2-[3-(2-(carbazol-9-il)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2365)

Il prodotto del titolo venne preparato secondo la procedura descritta nel *metodo B* a partire da metil 2-(3-idrossifeniltio)isobutirrato (preparato come descritto nell'esempio 1) (0.609 g, 2.7 mmoli), 9H-carbazol-9-etanolo (0.570 g, 2.7 mmoli), DIAD (0.708 g, 3.5 mmoli), trifenilfosfina (0.917 g, 3.5 mmoli) aggiunta a piccole porzioni mantenendo la temperatura al di sotto dei 30°C, in 14 mL di THF anidro. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per 18 ore a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/AcOEt 9/1. Si ottennero 0.510 g di prodotto (resa: 45 %); Pf: 101-103°C; TLC: gel di silice, eluente esano/AcOEt 8/2, Rf: 0.38; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 8.05 (d, 2H), 7.50 (m, 4H), 7.15 (m, 2H), 7.08 (t, 1H), 7.00 (d, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.80 (m, 1H), 4.75 (t, 2H), 4.35 (t, 2H), 3.60 (s, 3H), 1.40 (s, 6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C<sub>18</sub>, (5μm) 4.6 x 150 mm, T: ambiente, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 65/35 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.80 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 11.45 min; A.E. conforme per C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>S.

Esempio 7

Preparazione di metil 2-[4-(2-(carbazol-9-il)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2387)

Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel  
5 *metodo B* a partire da metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (preparato come descritto nell'esempio 3) (0.609 g, 2.7 mmoli), 9H-carbazol-9-etanolo (0.570 g, 2.7 mmoli), DIAD (0.708 g, 3.5 mmoli), trifenilfosfina (0.917 g, 3.5 mmoli) aggiunta a piccole porzioni  
mantenendo la temperatura al di sotto dei 30°C, in 14 mL di THF  
10 anidro. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per 18 ore a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/AcOEt 9/1. Si ottennero 0.702 g  
di prodotto (resa: 62 %); Pf: 72-74°C; TLC: gel di silice, eluente  
15 esano/AcOEt 8/2, Rf: 0.30; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 8.05 (d, 2H), 7.50 (m, 4H), 7.15 (m, 4H), 6.75 (d, 2H), 4.75 (t, 2H), 4.35 (t, 2H), 3.60 (s, 3H), 1.40 (s, 6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C<sub>18</sub>, (5μm) 4.6 x 150 mm, T: ambiente, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.80 mL/min, rivelatore UV 205 nm,  
20 tempo di ritenzione 11.60 min; A.E. conforme per C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>S.



Esempio 8

Preparazione di metil 2-[4-[2-(1-indolil)etossifeniltio]isobutirrato (ST1983)

Preparazione dell'intermedio 1-(2-idrossietil)indolo

- 5 L'intermedio, riportato in J. Med. Chem., 1998, 41/10, 1619-1639,  
venne preparato secondo la metodica ivi descritta, ad eccezione della  
durata del tempo di reazione (pari a 30 ore anziché 30 minuti), a  
partire da indolo (5.0 g, 42.7 mmoli), KOH (3.6 g, 64.1 mmoli) e da  
bromoetanolo (6.4 g, 51.3 mmoli) in 50 ml di DMSO anidro, a T: 25-  
10 30°C, per ottenere 5 g di prodotto oleoso (resa: 73%).

Preparazione di metil 2-[4-[2-(1-indolil)etossifeniltio]isobutirrato (ST1983)

- Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel  
*metodo B* a partire da metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato  
15 (preparato come descritto nell'esempio 3) (0.671 g, 2.97 mmoli), 1-(2-  
idrossietil)indolo (0.478 g, 2.97 mmoli), DEAD (0.672 g, 3.86 mmoli),  
trifenilfosfina (1.011 g, 3.86 mmoli) a piccole porzioni mantenendo la  
temperatura al di sotto dei 30°C, in 15 mL di THF anidro. La  
reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per 48 ore a  
20 temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne  
evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di  
silice usando come eluente esano/etile acetato 8/2. Si ottinnero  
complessivamente 0.500 g di prodotto ancora impuro che venne  
sciolto in etile acetato e lavato con una soluzione di NaOH 1N. La  
25 fase organica venne essiccata ed evaporata per dare un residuo di

0.230 g che venne nuovamente purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con CHCl<sub>3</sub>. Si ottennero 0.184 g di prodotto oleoso (resa: 17 %); TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 8/2, Rf: 0.29; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 7.62 (d, 1H), 7.40 - 7.10 (m, 6H), 6.78 (d, 2H), 6.50 (d, 1H), 4.50 (m, 2H), 4.24 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 1.40 (s, 6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C<sub>18</sub>, (3.5μm) 4.6 x 75 mm, T: ambiente, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 60/40 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.90 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 10.70 min; KF: 1.7 % H<sub>2</sub>O; A.E. conforme per C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>S.

10 **Esempio 9**

Preparazione di metil 2-[3-[2-(1-indolil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2394)

Il prodotto del titolo venne preparato secondo quanto descritto nel *metodo B* a partire da metil 2-(3-idrossifeniltio)isobutirrato (15 preparato come descritto nell'esempio 1) (1.00 g, 4.42 mmoli), e 1-(2-idrossietil) indolo (preparato come descritto nell'esempio 8) (0.711g, 4.42 mmoli) in 20 mL di THF anidro, a cui si aggiunsero DIAD (1.16 g, 5.75 mmoli) e trifenilfosfina (1.500 g, 5.75 mmoli) a piccole porzioni mantenendo la temperatura al di sotto dei 30°C. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/AcOEt 8/2. Si ottennero 0.581 g di prodotto oleoso (resa: 35%); TLC: gel di silice, eluente esano/AcOEt 9/1, Rf: 0.22; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 7.62 (d,

1H), 7.42 (d, 1H), 7.30 – 6.80 (m, 7H), 6.52 (d, 1H), 4.55 (m, 2H),  
4.30 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 1.50 (s, 6H); HPLC: Colonna: Supelco -  
C<sub>18</sub> (5 μm) 4.6 x 150 mm, T: 30°C, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 70/30  
(v/v), pH: tal quale, flusso: 0.90 mL/min, rivelatore UV 205 nm,  
tempo di ritenzione 6.36 min; A.E. conforme per C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>S.

**Esempio 10**

Preparazione di metil 2-[3-[2-(2-naftil)etossifeniltio]isobutirrato (ST2167)

Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel  
metodo B (ad eccezione del DEAD che venne sostituito con DIAD) a  
partire da metil 2-(3-idrossifeniltio)isobutirrato (preparato come  
descritto nell'esempio 1) (1.110 g, 4.9 mmoli), 2-(2-naftil)etanolo  
(0.842 g, 4.9 mmoli), DIAD (1.290 g, 6.37 mmoli), trifenilfosfina  
(1.670 g, 6.37 mmoli) in 20 mL di THF anidro. La reazione venne  
lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura  
ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il  
residuo purificato per cromatografia su gel di silice usando come  
eluente esano/AcOEt 7/3. Il prodotto venne ulteriormente purificato  
sciogliendolo in etile acetato e lavando la fase organica con una  
soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La fase organica venne seccata su sodio sulfato  
ed il solvente evaporato sotto vuoto. Si ottennero 1.14 g di prodotto  
(resa: 61.2%); TLC: gel di silice, eluente esano/AcOEt 9/1, R<sub>f</sub>: 0.20;  
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 7.80 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.45 (m, 3H),  
7.25 (t, 1H), 7.05 (m, 2H), 6.90 (d, 1H), 4.25 (t, 2H), 3.65 (s, 3H),  
3.30 (t, 2H), 1.50 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 (5μm) 4.6

x 250 mm, T: ambiente, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 80/20 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.9 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 18.91 min; KF: 1.0 % H<sub>2</sub>O; A.E. conforme per C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>S.

**Esempio 11**

Preparazione di metil 2-[4-[2-(2-naftil)etossifeniltio]isobutirrato (ST2011)

Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel metodo *B* a partire da metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (preparato come descritto nell'esempio 3) (1.000 g, 4.42 mmoli), 2-(2-naftil)etanolo (0.760 g, 4.42 mmoli), DEAD (1.000 g, 5.75 mmoli) e trifenilfosfina (1.500 g, 5.75 mmoli) a piccole porzioni mantenendo la temperatura al di sotto dei 30°C, in 30 mL di THF anidro. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/AcOEt 9/1. Si ottennero 1.262 g di prodotto (resa: 75%); Pf: 56-57°C; TLC: gel di silice, eluente esano/AcOEt 9/1, Rf: 0.23; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7.85 - 7.70 (m, 4H), 7.45 - 7.28 (m, 5H), 6.83 (d, 2H), 4.27 (t, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.26 (t, 2H), 1.45 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 (5μm) 4.6 x 250 mm, T: ambiente, fase mobile CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 80/20 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 23.51 min; KF: 0.16 % H<sub>2</sub>O; A.E. conforme per C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>S.



**Esempio 12**

Attività antidiabetica e ipolipemizzante nel topo db/db

Mutazioni negli animali da laboratorio hanno permesso di sviluppare dei modelli che presentano il diabete non-insulino dipendente associato all'obesità, all'iperlipidemia e all'insulino-resistenza e che permettono di testare l'efficacia di nuovi composti antidiabetici (*Reed and Scribner, Diabetes, obesity and metabolism 1: 75 - 86, 1999*).

Un modello di topo geneticamente diabetico molto utilizzato è il topo C57BL/KsJ db/db.

La base genetica di questo modello è un difetto nel gene del recettore della leptina, che determina leptino-resistenza e comporta iperfagia, obesità, iperinsulinemia e insulino-resistenza, con successivi sintomi di insufficiente secrezione insulare ed iperglicemia (*Kodama et al., Diabetologia 37: 739 - 744, 1994; Chen et al., Cell 84: 491 - 495, 1996*).

Poiché l'iperglicemia è accompagnata da obesità e insulino-resistenza, il topo db/db ha caratteristiche che lo avvicinano al diabete di tipo 2 dell'uomo ed è utile per il saggio di composti insulino-sensibilizzanti.

I topi C57BL/KsJ db/db degli esperimenti vennero forniti dalla Jackson Lab (via Ch. River). Dopo 10 gg di acclimatazione in condizioni standard ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;  $55 \pm 15\%$  di umidità; 15 - 20 / ora ricambi di aria; 12 ore di ciclo luce - oscurità con 7.00 - 19.00 luce) con dieta standard 4 RF21 (Mucedola), venne prelevato il sangue in condizioni di post-assorbimento (digiuno ore 8.30 - 16.30) dalla vena

caudale con l'aiuto di un catetere Jelco 22G (Johnson and Johnson).

Nel plasma vennero controllati i livelli di glucosio, insulina, trigliceridi, colesterolo, acidi grassi liberi e urea per un'omogenea distribuzione dei topi nei gruppi di trattamento.

5 All'inizio del trattamento venne controllato il peso corpo degli animali e predisposto il monitoraggio del consumo di acqua e mangime.

I topi vennero trattati due volte al giorno (ore 8.30 e 18.30), per via orale, per 14 giorni, con i composti secondo l'invenzione, usando 10 come composti di riferimento il rosiglitazone, il bezafibrato ed il fenofibrato.

I composti vennero somministrati alla dose equivalente a 25 mg/Kg del composto secondo l'invenzione ST2195 dell'esempio 1, in 10 ml/Kg di veicolo (CMC 1% contenente Tween 80 0,5% in H<sub>2</sub>O deionizzata). In particolare, il Rosiglitazone venne somministrato alla dose di 5 mg/kg (*Lohray et al. J. Med Chem 41, 1619 - 1630, 1998*), il bezafibrato a 24.8 mg/kg ed il fenofibrato a 24.7 mg/kg.

Nel corso dell'esperimento vennero monitorati i livelli di glicemia, la tolleranza al glucosio (Test OGTT), alcuni parametri del quadro 20 lipidico e il guadagno di peso.

I composti dell'invenzione furono in grado di abbassare i livelli della glicemia in condizioni di alimentazione (Tabella 1), di post-assorbimento (Tabella 2) e di digiuno (Tabella 3).

Furono in grado di migliorare la tolleranza al glucosio (Tabella 4) e di 25 ridurre la fruttosamina, un indice di glicazione delle proteine

(Tabella 5) che, come sopra citato, svolge un ruolo importante nello sviluppo delle complicanze micro - e macro - vascolari del diabete.

I composti dell'invenzione mostrarono inoltre una buona capacità di ridurre i livelli dei trigliceridi del siero in modo simile al Rosiglitazone 5 e al fenofibrato (Tabella 6).

Inoltre i composti dell'invenzione, diversamente dal Rosiglitazone, incrementarono i livelli di HDL - Colesterolo (Tabella 6) e determinarono un guadagno di peso inferiore a quello del Rosiglitazone e vicino a quello dei fibrati (Tabella 7).

- 10 Un incremento dei valori di HDL - Colesterolo costituisce un indice di agonismo PPAR $\alpha$  e di minor rischio di atherosclerosi. L'agonismo PPAR $\alpha$  infatti incrementa l'ossidazione degli acidi grassi nei tessuti, riducendo l'accumulo dei trigliceridi intracellulari, che favoriscono l'insulino - resistenza (*Virkamäki et al., Diabetes 50, 2337 - 2343, 2001; Mensink et al., Diabetes 50, 2545 - 2554, 2001; Kelley and Goodpaster, Diabetes Care 24, 933 - 941, 2001*).
- 15

Tabella 1

Livelli di glucosio nel sangue dei topi db/db, trattati per via orale  
due volte al giorno con il composto dell'esempio 1, con i fibrati (in  
dose equivalente ai 25 mg/Kg del composto dell'esempio 1) e con il  
Rosiglitazone (5 mg/Kg), dopo 12 giorni di trattamento.  
Prelievo nello stato di alimentazione, a circa 15 ore dall'ultimo  
trattamento.

Valori medi ± E.S. e variazione (%) vs controllo.

10

Composto	Dose mg/Kg	Glucosio mg/dl	Variazione %
Controllo		487 ± 25	
Rosiglitazone	5,0	365 ± 64	- 25
Bezafibrato	24,8	503 ± 21	+ 3
Fenofibrato	24,7	466 ± 8	- 4
Esempio 1	25,0	303 ± 16 ▲	- 38

Numero di animali per gruppo: 6.

Test 't' di Student: ▲ indica P <0,001 vs il Controllo.

Tabella 2

Livelli di glucosio nel sangue dei topi db/db, trattati per via orale  
due volte al giorno con il composto dell'esempio 1, con i fibrati (in  
dose equivalente ai 25 mg/Kg del composto dell'esempio 1) e con il  
Rosiglitazone (5 mg/Kg), dopo 12 giorni di trattamento.  
Prelievo nello stato di post-assorbimento (digiuno ore 9,00-17,00) e a  
8 ore dall'ultimo trattamento.

20 Valori medi ± E.S. e variazione (%) vs controllo.

Composto	Dose mg/Kg	Glucosio mg/dl	Variazione %
Controllo		414 ± 11	
Rosiglitazone	5,0	314 ± 33 □	- 24
Bezafibrato	24,8	421 ± 30	+ 2
Fenofibrato	24,7	409 ± 11	- 1
Esempio 1	25,0	216 ± 16 ▲	- 48

25 Numero di animali per gruppo: 6.

Test 't' di Student: □ e ▲ indicano rispettivamente P <0,05 e  
P <0,001 vs il Controllo.



Tabella 3

Livelli di glucosio nel sangue dei topi db/db, trattati per via orale due volte al giorno con il composto dell'esempio 1, con i fibrati (in dose equivalente ai 25 mg/Kg del composto dell'esempio 1) e con il Rosiglitazone (5 mg/Kg), dopo 18 giorni di trattamento  
 Prelievo nello stato di digiuno da 18 ore e a 5 ore dall'ultimo trattamento.

Valori medi ± E.S. e variazione (%) vs controllo.

10

Composto	Dose mg/Kg	Glucosio mg/dl	Variazione %
Controllo		344 ± 35	
Rosiglitazone	5,0	225 ± 27 ■	- 35
Bezafibrato	24,8	298 ± 21	- 13
Fenofibrato	24,7	384 ± 20	+ 12
Esempio 1	25,0	144 ± 3 Δ	- 58

Numero di animali per gruppo: 6.

Test 't' di Student: ■ e Δ indicano rispettivamente P <0,02 e P <0,01 vs il Controllo.

Tabella 4

- 5 Area sotto la curva (AUC) del glucosio al test dell'OGTT nel sangue dei topi db/db, trattati per via orale due volte al giorno con il composto dell'esempio 1, con i fibrati (in dose equivalente ai 25 mg/Kg del composto dell'esempio 1) e con il Rosiglitazone (5 mg/Kg), dopo 18 giorni di trattamento.
- Test OGTT (glucosio 3 g/Kg) nei topi a digiuno da 18 ore e a 5 ore dall'ultimo trattamento.
- 10 Valori medi ± E.S. e variazione (%) vs controllo.

Composto	Dose mg/Kg	AUC Glucosio u.a.	Variazione %
Controllo		51182 ± 2392	
Rosiglitazone	5,0	38174 ± 3555 Δ	- 25
Bezafibrato	24,8	44476 ± 1827	- 13
Fenofibrato	24,7	45192 ± 1546	- 12
Esempio 1	25,0	24527 ± 889 ▲	- 52

Numero di animali per gruppo: 6.

15 Test 't' di Student: Δ e ▲ indicano rispettivamente P <0,01 e P <0,001 vs il Controllo.

Tabella 5

- Livelli di glucosio e di fruttosamina nel plasma dei topi db/db, trattati per via orale due volte al giorno con il composto dell'esempio 1, con i fibrati (in dose equivalente ai 25 mg/Kg del composto dell'esempio 1) e con il Rosiglitazone (5 mg/Kg), dopo 25 giorni di trattamento.
- Prelievo nelle condizioni di post-assorbimento (digluno ore 9,00-16,30) e a 7,30 ore dall'ultimo trattamento.
- Valori medi ± E.S. e variazione (%) vs controllo.

Composto	Dose mg/Kg	Glucosio mg/dl	Variazione %	Fruttosamina mM	Variazione %
Controllo		456 ± 45		0,80 ± 0,03	
Rosiglitazone	5,0	296 ± 39 ■	- 35	0,52 ± 0,12	- 35
Bezafibrato	24,8	536 ± 22	+ 18	1,01 ± 0,04 Δ	+ 26
Fenofibrato	24,7	553 ± 30	+ 21	0,92 ± 0,02 Δ	+ 15
Esempio 1	25,0	206 ± 8 Δ	- 55	0,41 ± 0,04 ▲	- 49

Numero di animali per gruppo: 6.  
 Test 't' di Student: ■, Δ e ▲ indicano rispettivamente P < 0,02, P < 0,01 e P < 0,001 vs il Controllo.

Tabella 6

- Livelli di trigliceridi e HDL-colesterolo nel plasma dei topi db/db, trattati per via orale due volte al giorno con il composto dell'esempio 1, con i fibrati (in dose equivalente ai 25 mg/Kg del composto dell'esempio 1) e con il Rosiglitazone (5 mg/Kg), dopo 25 giorni di trattamento.
- Prelievo nelle condizioni di post-assorbimento (digiuno ore 9,00-16,30) e a 7,30 ore dall'ultimo trattamento.
- Valori medi  $\pm$  E.S. e variazione (%) vs controllo.

Composto	Dose mg/Kg	Trigliceridi mg/dl	Variazione %	HDL-Coles. mg/dl	Variazione %
Controllo		95,4 $\pm$ 7,2		82,0 $\pm$ 6,1	
Rosiglitazone	5,0	43,7 $\pm$ 4,1 ▲	- 54	65,4 $\pm$ 3,6 □	- 20
Bezafibrato	24,8	88,3 $\pm$ 12,7	- 7	93,8 $\pm$ 3,8	+ 14
Fenofibrato	24,7	66,5 $\pm$ 3,5 Δ	- 30	96,4 $\pm$ 4,2	+ 1,8
Esempio 1	25,0	45,3 $\pm$ 2,3 ▲	- 53	98,0 $\pm$ 3,5 □	+ 20

Numero di animali per gruppo: 6.

Test 't' di Student: □, Δ e ▲ indicano rispettivamente  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  vs il Controllo.



Tabella 7

Peso Corpo iniziale e finale dei topi db/db, trattati per via orale due volte al giorno con il composto dell'esempio 1, con i fibrati (in dose equivalente ai 25 mg/Kg del composto dell'esempio 1) e con il Rosiglitazone (5 mg/Kg), dopo 25 giorni di trattamento.  
 Rilevamento nello stato di post-assorbimento (digiuno ore 9,00-16,30).

Valori medi ± E.S. e variazione (%) vs controllo.

10

Composto	Dose mg/Kg	Corpo Iniz. g	Variazione %	P. Corpo Fin. g	Variazione %
Controllo		31,7 ± 0,9		28,3 ± 0,8	
Rosiglitazone	5,0	32,6 ± 1,4	+ 3	42,1 ± 2,5 Δ	+ 49
Bezafibrato	24,8	33,7 ± 0,7	+ 6	35,2 ± 1,3 ▲	+ 24
Fenofibrato	24,7	33,3 ± 0,7	+ 5	34,5 ± 1,0 ▲	+ 22
Esempio 1	25,0	32,3 ± 0,3	+ 2	35,9 ± 0,6 ▲	+ 27

Numero di animali per gruppo: 6.

Test 't' di Student: Δ, ▲ indicano rispettivamente P < 0,01 e P < 0,001 vs il Controllo.

Esempio 13

Trasfezione transiente di cellule eucariotiche per valutare l'attività agonistica di ligandi del PPAR $\alpha$

In questo esempio viene dimostrato che i composti secondo  
5 l'invenzione hanno anche attività PPAR alfa agonista.

L'identificazione di agonisti del PPAR $\alpha$  avviene tramite uno screening  
*in vitro* basato su tecniche di biologia cellulare.

I saggi di transattivazione in cellule eucariotiche consentono di  
valutare quantitativamente l'abilità di un ipotetico ligando nel  
10 favorire l'interazione di un fattore trascrizionale col proprio elemento  
di risposta all'interno di un promotore [Sladek R. et al., in: *Nuclear  
Receptors: A Practical Approach*, Oxford Press pag 63-68 (1999)].

Perchè il Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )  
eserciti la sua funzione di modulatore trascrizionale è necessaria la  
15 sua dimerizzazione con il recettore per l'acido 9-cis retinoico (RXR). Il  
dимеро formatosi è in grado di legarsi all'elemento di risposta ai  
proliferatori perossisomiali (PPRE), localizzato nel promotore dei geni  
bersaglio, solo se attivato dalla presenza di un ligando di almeno  
uno dei due recettori [Berger J. and Moller D.E., *Annu. Rev. Med.* **53**,  
20 409-35 (2002)].

Un saggio di transattivazione richiede quindi la contemporanea  
presenza nella linea cellulare prescelta:

- a) di una quantità sufficiente di PPAR $\alpha$ ;
- b) di una quantità sufficiente del recettore per l'acido 9 *cis*-retinoico  
25 (RXR);

c) di un plasmide chimerico contenente il gene-reporter controllato da un PPRE, posto a monte di un promotore eterologo virale. Nel nostro caso il gene-reporter è la cloramfenicolo-acetil trasferasi (CAT).

5 Qualora i livelli endogeni di PPAR $\alpha$  ed RXR siano insufficienti, essi possono essere supplementati dall'esterno, tramite trasfezione di vettori d'espressione contenenti i geni dei recettori in questione [Kersten S. and Wahli W. in: *Nuclear Receptors: A Practical Approach*, Oxford Press pag 74-76 (1999)].

10 Il plasmide pCH110 contiene il gene per la  $\beta$ -galattosidasi e viene co-trasfettato insieme al gene-reporter CAT, fornendo il controllo interno per l'efficienza di trasfezione e la normalizzazione dei risultati.

15 Utilizzando questo sistema di trasfezione e di gene reporter non ci si svincola però completamente dalle possibili interferenze da parte di eventuali recettori endogeni espressi costitutivamente dalla linea cellulare utilizzata.

Venne usato quindi un metodo alternativo che consente di aggirare il problema dell'interferenza da parte di un eventuale recettore  
20 endogeno.

In questo modello si utilizza un saggio di transattivazione in cui il vettore di espressione mPPAR $\alpha$ LBD/Gal4DBD consente la sintesi da parte della cellula trasfettata di una proteina chimerica, in cui il *ligand binding domain* (LBD) del PPAR $\alpha$  risulta fuso al *DNA binding*



domain (DBD) del fattore di trascrizione GAL4 di lievito [Luckow B. et al., *Nucleic Acids Res.* 15, 54-90 (1997)]. Contemporaneamente si trasfetta un plasmide (pG5CAT) che contiene 5 copie del sito di legame ad alta affinità per il GAL4 (chiamato anche UAS, *upstream activating sequence*), a monte del promotore virale E1b fuso con il gene reporter CAT [Moya-Camarena S.Y. et al., *J. Lipid Res.* 40 (8), 1426-33 (1999)]. Questo modello elimina qualsiasi interferenza da parte di eventuali recettori endogeni. Ciò è dovuto al fatto che l'attivazione di E1b e la produzione di CAT si verificherà esclusivamente grazie all'interazione del GAL4DBD con il proprio elemento di risposta (UAS). Poiché il fattore di trascrizione GAL4 non è espresso in cellule eucariotiche, la transattivazione del gene reporter può avvenire solo quando, in seguito all'interazione di un ligando con l'LBD del PPAR $\alpha$ , la proteina chimerica PPAR $\alpha$ /GAL4 riconosce la sequenza UAS sul plasmide CAT. Unitamente al vettore di espressione e al vettore reporter le cellule furono trasfettate anche con il plasmide pCH110 che fornisce il controllo interno per l'efficienza di trasfezione e la normalizzazione dei risultati.

#### Procedura sperimentale

- 20 Venne usata una linea cellulare di fibroblasti di rene di scimmia (COS-7) [Elbrecht A. et al., *J. Biol. Chem.* 274 (12), 7913-22 (1999)]. Le cellule vennero trasfettate con il vettore reporter, il plasmide di espressione codificante la proteina di fusione Gal4DBD/PPAR $\alpha$ LBD e il vettore di controllo pCH110. Le cellule vennero esposte a 25 concentrazioni crescenti dei composti in esame e venne valutata

l'attività della CAT. Come controllo vennero usate cellule non trattate.

### Coltura cellulare

Fibroblasti di rene di scimmia (COS-7) vennero coltivati secondo le usuali tecniche di coltura cellulare, a 37°C in atmosfera a 5% v/v di anidride carbonica usando come mezzo di crescita DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) modificato con 3,7 g/l di bicarbonato di sodio, 4 mM di L-glutamina, 4,5 g/l di glucosio, 1 mM di piruvato di sodio e 10% v/v di foetal bovine serum, in presenza di streptomicina 100 µg/ml e penicillina 100 U/ml finali.

### Trasfezioni transitorie di cellule COS-7

Le cellule vennero co-trasfettate utilizzando il reagente di trasfezione FuGENE6 (Roche), costituito da una miscela definita di lipidi in grado di complessare il DNA e di veicolarlo all'interno delle cellule. 15 24 ore prima della trasfezione le cellule vennero piastrate alla densità di  $1.2 \times 10^5$  cellule/pozzetto in piastre da 12 pozetti e mantenute a 37°C in atmosfera a 5% v/v di CO<sub>2</sub>. Il mezzo di coltura, privo di siero, venne sostituito 2 ore prima della trasfezione, quindi le cellule vennero trattate con il reagente di trasfezione FuGENE6 20 secondo le istruzioni suggerite dalla ditta fornitrice. Brevemente, la miscela di trasfezione contenente per ogni pozzetto 0.8 µg del vettore di espressione, 1.6 µg del vettore reporter, 0.8 µg del vettore controllo e 9 µl del reagente FuGENE6 venne aggiunta direttamente alle cellule in presenza di terreno di coltura privo di siero. Dopo 5 ore, il

terreno di trasfezione venne sostituito da 1 ml di terreno di coltura completo di siero ed antibiotici in presenza o in assenza delle molecole da testare a 3 differenti concentrazioni (2, 20 e 100  $\mu$ M). Come composto di riferimento positivo venne usato il Wy-14,643 (2  $\mu$ M), noto ligando del PPAR $\alpha$ .

Preparazione di estratti proteici cellulari e saggio di attività CAT

Dopo 48 ore d'incubazione a 37°C in atmosfera a 5% v/v di CO<sub>2</sub>, le cellule vennero lavate 2 volte con 1 ml di tampone fosfato (PBS) e rimosse meccanicamente dal pozzetto in tampone TEN (Tris 10 [idrossimetil] amminometano 10 mM pH 8, acido etilendiammino tetraacetico 1mM pH 8, cloruro di sodio 0.1 M). Dopo centrifugazione per 3 minuti a 1000 rotazioni per minuto (rpm), le cellule furono risospese in 65  $\mu$ l di tampone di lisi (Tris-HCl 0.25 M, pH8) quindi lisate grazie a tre rapidi cicli di congelamento-15 scongelamento. I materiali insolubili cellulari (debris) vennero rimossi per centrifugazione a 15000 rpm per 15 minuti a 4°C ed il surnatante venne recuperato ed utilizzato per i saggi dell'attività della CAT e della  $\beta$ -galattosidasi.

Gli estratti cellulari vennero conservati a -80°C fino al momento dei 20 saggi dopo aver preventivamente aggiunto glicerolo (concentrazione finale 10% v/v) e  $\beta$ -mercaptoetanolo (finale 5 mM) in un volume finale di 75  $\mu$ l.

Il saggio per la valutazione dell'attività CAT venne realizzato applicando una variante del metodo descritto da Sleigh [Sleigh M.J.

*Annal Biochem.*, 156 (1) , 251-6 (1986)]. Brevemente: 20  $\mu$ l di estratto cellulare proteico (preriscaldato a 65°C per 10 min per disattivare le attività enzimatiche deacetilanti interne) vennero aggiunti ad una soluzione contenente 10  $\mu$ l di n-butirril-CoenzimaA 5 (3.5 mg/ml), 5  $\mu$ l di [ $^{14}$ C]-cloramfenicolo (0.25  $\mu$ Ci) e 65  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O distillata. Dopo 2 ore di incubazione a 37°C la reazione venne bloccata con 200  $\mu$ l di una soluzione di xilene/2,6,10,14 tetrametil-pentadecano (1:2 v/v). Dopo una vigorosa agitazione e centrifugazione per 5 min a velocità massima, 150  $\mu$ l del surnatante 10 vennero aggiunti a 5 ml di liquido di scintillazione ed analizzati al beta counter (scintillatore) per determinare il contenuto di [ $^{14}$ C] butirril-cloramfenicolo formatosi in seguito alla reazione enzimatica.

Test per la determinazione dell'attività  $\beta$ -galattosidasica

Come controllo interno per la normalizzazione dell'attività della CAT 15 in rapporto all'efficienza di trasfezione si usò l'attività  $\beta$ -galattosidasica codificata dal gene corrispondente nel plasmide pCH110 co-trasfettato.

L'attività  $\beta$ -galattosidasica venne misurata in accordo ad una variante del metodo descritto da Sambrook [Sambrook et al. in: 20 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]. Brevemente: 20  $\mu$ l di estratti proteici vennero aggiunti a 750  $\mu$ l del tampone di reazione contenente 1 volume di 2 mg/ml ONPG (O-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside) e 3 volumi di "Z buffer" (10 mM cloruro di

potassio, 1 mM cloruro di magnesio, 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanolo in tampone fosfato). La reazione fu eseguita a 37°C e interrotta aggiungendo 200  $\mu$ L di una soluzione di carbonato di sodio 1 M quando divenne evidente l'apparizione della tipica colorazione gialla.

I campioni vennero incubati per 10 min a temperatura ambiente e quindi analizzati allo spettrofotometro misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 420 nm ( $A_{420}$ ).

Per la normalizzazione dei risultati del saggio CAT rispetto all'attività  $\beta$ -galattosidasica venne usata la seguente formula:

10

conte per minuto (cpm) campione CAT - conte per minuto (cpm)

bianco

---

unità di  $\beta$ -galattosidasi \*

15

unità di  $\beta$ -galattosidasi \* =  $\frac{A_{420} \times \text{fattore di diluizione}}{\text{tempo di incubazione (min)}}$

In Tabella 8 è riportata a titolo di esempio l'attività alfa agonista del  
20 composto dell'esempio 1.



**Tabella 8**

Saggio di transattivazione mediata da mPPAR $\alpha$ LBD/Gal4DBD in cellule COS-7. I risultati sono espressi come attivazione percentuale del gene reporter CAT rispetto a quella misurata in presenza del composto di riferimento (WY-14,643 2  $\mu$ M), pari per convenzione al 100%.

Composto	Concentrazione		
	2 $\mu$ M	20 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Esempio 1	44.9%	129.9%	232.1%

I risultati ottenuti, riportati in tabella 1-7, mostrano che i composti secondo l'invenzione sono agenti utili per il trattamento del diabete, delle iperlipidemia, per aumentare i livelli di HDL colesterolo e per prevenire e curare le complicanze legate al diabete ed alla insulino resistenza, e per la prevenzione primaria e secondaria del CHD.

Sono oggetto della presente invenzione composizioni farmaceutiche comprendenti come principio attivo almeno un composto di formula (I), da solo o in associazione con uno o più composti di formula (I), oppure, detto composto o detti composti di formula (I) in associazione con altri principi attivi utili nel trattamento delle patologie indicate nella presente invenzione, ad esempio altri prodotti con attività ipoglicemizzante e ipolipidemizzante; anche in forme di dosaggio separate o in forme adatte a terapie combinate. Il

principio attivo secondo la presente invenzione sarà in miscela con opportuni veicoli e/o eccipienti di comune uso in tecnica farmaceutica, come ad esempio descritto in "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", ultima edizione. Le 5 composizioni secondo la presente invenzione conterranno una quantità terapeuticamente efficace del principio attivo. I dosaggi saranno determinati dall'esperto del settore, ad esempio il clinico o il medico curante a seconda del tipo di patologia da trattare e le condizioni del paziente, oppure in concomitanza con la 10 somministrazione di altri principi attivi. A titolo di esempio si possono indicare dosaggi compresi fra 0.01 e 400 mg, preferito è il dosaggio di 0.1 e 200 mg/die.

Esempi di composizioni farmaceutiche sono quelle che permettono la somministrazione per via orale o parenterale, per via endovenosa, 15 intramuscolare, sottocutanea, transdermica. Composizioni farmaceutiche adatte allo scopo sono compresse, capsule, rigide o molli, polveri, soluzioni, sospensioni, sciroppi, forme solide per preparazioni liquide estemporanee. Composizioni per somministrazione parenterale sono ad esempio tutte le forme 20 iniettabili per intramuscolo, endovena, sottocute, sotto forma di soluzioni, sospensioni, emulsioni. Vanno anche menzionate le formulazioni liposomiali. Sono anche comprese le forme a cessione controllata del principio attivo, sia come somministrazione orale, compresse rivestite con opportuni strati, polveri microincapsulate, 25 complessi con ciclodestrine, forme deposito, ad esempio sottocute,

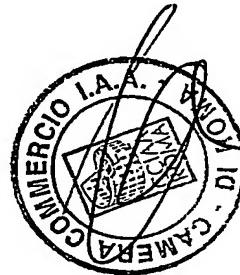
SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE  
RIUNITE S.p.A.

44

come iniezioni deposito o impianti.

**SIGMA TAU**  
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.  
Viale Shakespeare, 47  
00144 ROMA

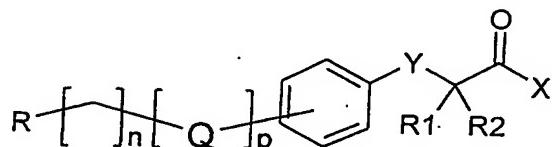
*Damjanelli*



## RIVENDICAZIONI

RM 2002 A 000629

## 1. Uso dei composti di formula (I):



(I)



5

in cui:

R rappresenta -H; arile o eteroarile, mono, biciclici o triciclici eventualmente sostituiti con uno o più gruppi alogeno, nitro, idrossi, alchile e alcossi eventualmente sostituiti con uno o più gruppi alogeno;

10

n rappresenta 0-3;

p rappresenta 0-1;

X rappresenta -OH, -O-alchile C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

15

R1 ed R2 uguali o diversi sono scelti tra: -H; alchile C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, -COX;

Q è scelto fra: NH, O, S, -NHC(O)O-, NHC(O)NH-, -NHC(O)S-, -OC(O)NH-, -NHC(S)O-, -NHC(S)NH-, -C(O)NH-;

e Y rappresenta O, S;

20

e dei loro sali farmaceuticamente accettabili, le miscele racemiche, i singoli enantiomeri, stereoisomeri o isomeri geometrici e tautomeri, per la preparazione di un medicamento

per la profilassi ed il trattamento delle iperlipidemie e iperglicemie.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, nei quali R è un arile,

eventualmente sostituito con uno o più atomi di alogeno, alchile,

5 alcossi o aloalchile, preferibilmente metile, metossi o trifluorometile, nitro, mono- o di-alchilammina, preferibilmente p

è 1, n è 0, 1 o 2, Q è ossigeno.

3. Uso secondo la rivendicazione 1, nei quali R è un eteroarile,

preferibilmente contenente azoto come eteroatomo, ad esempio

10 indolo e carbazolo, legati al resto della molecola attraverso tutte

le posizioni consentite; sono particolarmente preferiti i gruppi 1-

indolile e 1-carbazolile, e preferibilmente p è 1, n è 0, 1 o 2, Q è

ossigeno.

4. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui il composto viene scelto

15 nel gruppo consistente di:

i. Metil 2-[3-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]isobutirrato  
(ST2195);

ii. Acido 2-[3-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]-2-metilpropanoico  
(ST2518);

20 iii. Metil 2-[4-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]isobutirrato  
(ST1929);

iv. Metil 2-[3-(2-(2,4-diclorofenil)etossi)feniltio]isobutirrato  
(ST2534);

v. Metil 2-[4-(2-(2,4-diclorofenil)etossi)feniltio]isobutirrato  
(ST2531);

- vi. Metil 2-[3-(2-(carbazol-9-il)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2365);
  - vii. Metil 2-[4-(2-(carbazol-9-il)etossi)feniltio]isobutirrato (ST2387);
  - 5 viii. Metil 2-[4-[2-(1-indolil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST1983);
  - ix. Metil 2-[3-[2-(1-indolil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2394);
  - x. Metil 2-[3-[2-(2-naftil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2167);
  - xi. Metil 2-[4-[2-(2-naftil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2011).
5. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui il composto è Metil 2-[3-  
10 [2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST2195).
6. Uso secondo la rivendicazione 1, per la profilassi ed il  
trattamento del diabete, in particolare di tipo 2, delle  
complicanze microvascolari del diabete, quali la retinopatia  
diabetica, la neuropatia diabetica, la nefropatia diabetica; delle  
15 complicanze macrovascolari del diabete, quali l'aterosclerosi, le  
vasculopatie periferiche, l'infarto del miocardio e l'ictus.
7. Uso secondo la rivendicazione 1 per la profilassi ed il  
trattamento della sindrome X, della sindrome policistica ovarica,  
dell'obesità, e delle varie forme di insulino-resistenza.
- 20 8. Uso secondo la rivendicazione 1, per la prevenzione e  
trattamento delle iperlipidemie, delle ipercolesterolemie,  
dell'ipertensione, per la prevenzione primaria e secondaria del  
CHD (coronary heart disease), e per aumentare i livelli del  
colesterolo HDL.

9. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui il medicamento è in forma di compresse, capsule, rigide o molli, polveri, soluzioni, sospensioni, sciroppi, forme solide per preparazioni liquide estemporanee, emulsioni, liposomiali, forme a cessione controllata del principio attivo, compresse rivestite con opportuni strati, polveri microincapsulate, complessi con ciclodestrine, forme deposito, ad esempio sottocute, come iniezioni deposito o impianti.
10. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui il medicamento è somministrabile per via orale o parenterale.
11. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui il composto di formula (I) è presente ad una dose compresa tra 0.01 e 400 mg.
12. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui il composto di formula (I) è presente ad una dose compresa tra 0.1 e 200 mg.
13. Composizione farmaceutica comprendente come principio attivo almeno un composto di formula (I) in miscela con uno o più veicoli e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili.

